

Esterification and ester cleavage of unsatd. sugar cpds. - with esterase or lipase, for regioselective prodn. of cpds. useful in synthesis of glyco-conjugates, thromboxane(s), etc.

Patent Number : EP-337920

International patents classification : C07D-309/30 C07H-001/00 C12N-009/16 C07H-005/04 C07H-005/06 C12N-009/18 C12N-009/20 C12P-007/00 C12P-017/06

• Abstract :

EP-337920 A Enzymatic esterification and ester cleavage with lipases and esterases uses as substrate an unsatd. sugar cpd. of formula (I). (a) R1, R2 and R3 = 1-10C acyloxy and/or benzyloxy; (b) R1, R2 and R3 = OH; (c) R1 = protected OH; R2 and R3 = 1-10C acyloxy and/or benzyloxy; (d) R1 and R3 = 1-10C acyloxy and/or benzyloxy; R2 = protected OH; (e) R1 or R2 = protected OH, the other 2 of R1, R2 and R3 = OH; (f) R1 and R2 = OH; R3 = 1-10C acyloxy, benzyloxy or protected OH; (g) R1 and R2 = acyloxy and/or benzyloxy; R3 = protected OH; C atoms of acyloxy gps. can be substd. by halo, amino, OMe, phenyl and/or phenoxy, and the C atoms of benzyloxy can be substd. by NO₂, halo and/or 1-2C alkoxy. Cpd. (I) are new where (1) R1 = OH; R2 and R3 = 1-10C acyloxy and/or benzyloxy; (2) R1 and R3 = 1-10C acyloxy and/or benzyloxy; R2 = OH; or (3) R1 and R2 = OH; R3 = 1-10C acyloxy or benzyloxy, and their OH-protected derivs., all opt. substd. as above.

The OH gp. in (I) can be protected as ester or ether, or converted to acetal. Reaction of primary functional gps. is with lipase or esterase from *Candida* species, while sec. functional gps. are reacted with enzymes from *Pseudomonas* species. Alternatively, enzymes from animal pancreas and liver are used. Enzymes can be immobilised conventionally. Esterification is pref. at 10-50 deg.C using esp. vinyl esters as benzoyl or acyl donor. Hydrolysis is at pH 4-8.

USE/ADVANTAGE - This method provides a highly regioselective reaction, and products are formed in high yields, with simple work-up and with high reaction rate. Products are useful as intermediates, e.g. for glyco-conjugates; di- or oligo-saccharides; 2-deoxysugars; amino sugars; thromboxans and compactin. (0/0)

EP-337920 B A process for preparing compounds of the formula (I) in which R1 is hydroxyl and R2 and R3 are (1-10C)-acyloxy and/or benzyloxy, R1 and R3 are 1-10C acyloxy or benzyloxy, and are also the hydroxyl-protected derivatives, where the carbon atoms of the acyloxy group can be substituted by halogen and/or amine and/or methoxy and/or phenyl and/or phenoxy and the carbon atoms of the benzoyl group can be substituted by nitro and/or halogen and/or 1-2C-alkoxy, obtained by regioselective or regiospecific reaction by means of enzymic esterification of ester cleavage using lipases and esterases in the R1 and/or R3 position(s) from compounds of the formula (I) in which R1, R2, and R3 are 1-10C acyloxy and/or benzyloxy, R1, R2 and R3 are hydroxyl; R1 is a protected hydroxyl and R2 and R3 are 1-10C acyloxy and/or benzyloxy R1 and R3 are 1-10C acyloxy and/or benzyloxy and R2 is a protected hydroxyl, R1 is a protected hydroxyl and R2 and R3 are hydroxyl, R1 and R3 are hydroxyl and R2 is a protected hydroxyl, R1 and R2 are hydroxyl and R3 is 1-10C acyloxy or benzyloxy or a protected hydroxyl, and R1 and R2 are acyloxy and/or benzyloxy and R3 is a protected hydroxyl, where the carbon atoms of the acyloxy groups can be substituted by halogen and/or amino and/or methoxy and/or phenyl and/or phenoxy and the carbon atoms of the benzoyloxy group can be substituted by nitro and/or halogen and/or 1-2C alkoxy. (Dwg.0/0)

EP-337920 B A process for preparing compounds of the formula (I) in which R1 is hydroxyl and R2 and R3 are (1-10C)-acyloxy and/or benzyloxy, R1 and R3 are 1-10C acyloxy or benzyloxy, and are also the hydroxyl-protected derivatives, where the carbon atoms of the acyloxy group can be substituted by halogen and/or amine and/or methoxy and/or phenyl and/or phenoxy and the carbon atoms of the benzoyl group can be substituted by nitro and/or halogen and/or 1-2C-alkoxy, obtained by regioselective or regiospecific reaction by means of enzymic esterification of ester cleavage using lipases and esterases in the R1 and/or R3 position(s) from compounds of the formula (I) in which R1, R2, and R3 are 1-10C acyloxy and/or benzyloxy, R1, R2 and R3 are hydroxyl; R1 is a protected hydroxyl and R2 and R3 are 1-10C acyloxy and/or benzyloxy R1 and R3 are 1-10C acyloxy and/or benzyloxy and R2 is a protected hydroxyl, R1 is a protected hydroxyl and R2 and R3 are hydroxyl, R1 and R3 are hydroxyl and R2 is a protected hydroxyl, R1 and R2 are hydroxyl and R3 is 1-10C acyloxy or benzyloxy or a protected hydroxyl, and R1 and R2 are acyloxy and/or benzyloxy and R3 is a protected hydroxyl, where the carbon atoms of the acyloxy groups can be substituted by halogen and/or amino and/or methoxy and/or phenyl and/or phenoxy and the carbon atoms of the benzoyloxy group can be substituted by nitro and/or halogen and/or 1-2C alkoxy. ((Dwg.0/0))

US5380659 A Enzymatic esterification or ester enzymolysis comprises treatment of unsatd. sugar derivs. (or 2,3-dihydropyranone derivs.) of formula (I) with one or more lipases or esterases; and recovery of the prods..

In (I), either R1-R3 = A; or R1 = R3 = OH and the other is opt. protected OH; or R1 = OH and one of R2 and R3 = OH and the other is A; where the protecting gp. is ester, ether or acetal; and A = (1-10C)acyloxy or benzyloxy.

USE/ADVANTAGE - The OH gp. in these unsatd. sugar derivs. are esterified by transesterification in the presence of lipases; or esterified OH gps. are hydrolysed by esterases; and the prods. are valuable intermediates for further carbohydrate derivs.. The processes occur under very mild conditions (e.g. at about 20 deg.C for 12 hrs.) and are highly regiospecific; and the enzymes are recoverable for further use. (Dwg.0/0)

US5496930 A Cpd. of formula (I)

R1 = hydroxyl;

R2,R3 = 1-10C acyloxy and benzyloxy, or

R1,R3 = 1-10C acyloxy and benzyloxy, and

R2 is hydroxyl, or

R1,R2 = hydroxyl, and

R3 = 1-10C acyloxy or benzyloxy, or a hydroxyl-protected deriv. thereof, it being possible for the carbon atoms of an acyloxy group to be substd. with one or more of halo, amino, methoxy, phenyl and phenoxy, and for the carbon atoms of a benzyloxy gp. to be substd. with one or more of nitro, halo and C1 and C2 alkoxy, with the exception of (I);

R1,R3 = benzyloxy, and

R2 = hydroxyl. (Dwg.0/0)

*** Publication data :**

Patent Family : EP-337920 A 19891018 DW1989-42 Ger 7p *

AP: 1989EP-0710022 19890403 DSR: CH DE FR GB IT LI NL

US5380659 A 19950110 DW1995-08 C12N-009/16 6p AP:

1989US-0336480 19890412; 1992US-0924799 19920806

US5496930 A 19960305 DW1996-15 C07H-001/00 5p

FD: Div ex US5380659 AP: 1989US-0336480 19890412; 1992US-

0924799 19920806; 1994US-0315500 19940930

JP2916163 B2 19990705 DW1999-32 C07D-309/30 7p FD:

*** Patentee & Inventor(s) :**

Patent assignee : (FARH) HOECHST AG

Inventor(s) : HOLLÄ W; KELLER R

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Previous Publ. JP1311080 AP: 1989JP-0091984 19890413
EP-337920 B1 19950816 DW1995-37 C07D-309/30 Ger 12p AP:
1989EP-0710022 19890405 DSR: CH DE FR GB IT LI NL
DE58909383 G 19950921 DW1995-43 C07D-309/30 FD: Based
on EP-337920 AP: 1989DE-5009383 19890405; 1989EP-0710022
19890405
DE3910970 A 19891026 DW1989-44 AP: 1989DE-3910970
19890405
JP01311080 A 19891215 DW1990-05 AP: 1989JP-0091984
19890413
Priority n° : 1988DE-3828190 19880819; 1988DE-3812409
19880414
Covered countries : 9
Publications count : 8
Cited patents : 3.Jnl.Ref; A3...9041; No-SR.Pub; 2.Jnl.Ref

* Accession codes :
Accession N° : 1989-302632 [42]
Sec. Acc. n° CPI : C1989-133831

* Derwent codes :
Manual code : CPI: B07-A02 D05-A02C
D05-C E07-A03C
Derwent Classes : B03 D16 D17 E13

* Update codes :
Basic update code : 1989-42
Equiv. update code : 1989-44; 1990-05;
1995-08; 1995-37; 1995-43; 1996-15; 1999-
32

THIS PAGE BLANK (USPTO)



⑫

EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

⑬ Anmeldenummer: 89710022.8

⑮ Int. Cl. 4: C 07 D 309/30
C 12 P 17/06

⑭ Anmeldetag: 05.04.89

⑯ Priorität: 14.04.88 DE 3812409
19.08.88 DE 3828190

⑰ Anmelder: HOECHST AKTIENGESELLSCHAFT
Postfach 80 03 20
D-6230 Frankfurt am Main 80 (DE)

⑱ Veröffentlichungstag der Anmeldung:
18.10.89 Patentblatt 89/42

⑲ Erfinder: Holla, Wolfgang, Dr.
Am Obertor 30
D-6238 Hofheim am Taunus (DE)

⑳ Benannte Vertragsstaaten:
CH DE FR GB IT LI NL

Keller, Reinhold, Dr.
Kaunweg 8
D-6232 Soden am Taunus (DE)

㉑ Verfahren zur hochregioselektiven Veresterung und Estersspaltung an ungesättigten Zuckerverbindungen mit Hilfe von Lipasen und Esterasen und mit diesem Verfahren herstellbare Produkte.

㉒ An ungesättigten Zuckerverbindungen können mit Hilfe von Lipasen und Esterasen hochregioselektive Veresterungen und Estersspaltungen durchgeführt werden. Es werden bevorzugt Lipasen aus Mikroorganismen bzw. aus Pankreas und Leber von Tieren verwendet.

EP 0 337 920 A2

Beschreibung**Verfahren zur hochregioselektiven Veresterung und Esterspaltung an ungesättigten Zuckerverbindungen mit Hilfe von Lipasen und Esterasen und mit diesem Verfahren herstellbare Produkte**

Ungesättigte Zucker finden als Synthesebausteine eine breite Anwendung, beispielsweise bei der Herstellung von Glycokonjugaten, Disacchariden, Oligosacchariden, 2-Deoxyzuckern, Aminozuckern, Thromboxanen und dem Lactonteil des Compactins.

Die für diese Synthesen notwendigen regioselektiven Transformationen bzw. Modifikationen der ungesättigten Zucker stellen in der organischen Chemie häufig ein Problem dar und erfordern schwierige bzw. aufwendige Reaktionsfolgen. Für die regioselektive chemische Acylierung der zahlreichen Hydroxylgruppen ist die zeitaufwändige Einführung und spätere Abspaltung von speziellen Schutzgruppen notwendig.

Es ist bekannt, daß regioselektive Veresterungen und Esterspaltungen an primären Hydroxylgruppen einfacher gesättigter Zucker mit Hilfe von ausgewählten Lipasen durchgeführt werden können [Therisod M, Klibanov A.M., J. Am. Chem. Soc. 108, 5638, (1986); Sweers H.M., Wong C.H., J. Am. Chem. Soc. 108, 6421 (1986); Kloosterman M. et al. Tetrahedron Letters 28, 2989 (1987)]. Die von Therisod und Klibanov beschriebenen Reaktionen erfordern große Enzymüberschüsse, Reaktionszeiten von mindestens zwei Tagen, wobei die Umsätze meistens unter 50 % liegen.

Sweers und Wong beschreiben die regioselektive enzymatische Spaltung von 2,3,4,6-Tetra-O-acyl-D-hexopyranosiden zum 6-OH-Derivat. Bei den Acylresten handelt es sich jedoch um langkettige Ester.

Von Kloostermann ist die regioselektive Deacetylierung von Methyl-2,3,4,6-Tetra-O-acetyl- α -D-glucopyranosid beschrieben.

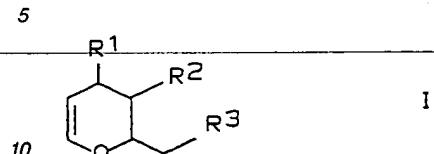
Die enzymatischen Esterspaltungen von Monosaccharidpentaacetaten führen zu komplexen Mischungen verschiedener Regiosomener. So erhalten Shaw und Klibanov [Biotech. Bioeng. 29, 648 (1987)] Gramm-Mengen von Glucose-2,3,4,6-tetraacetat, Glucosetriacetat, und zwar eine Mischung aus 2,4,6- und 3,4,6-Triacetat, sowie Glucose-4,6-diacetat.

Es wurde nun gefunden, daß ungesättigte Zucker mit Hilfe von Lipasen und Esterasen regiospezifisch bzw. regioselektiv verestert bzw. je nach Bedingungen die Esterbindungen auch gespalten werden können. Dies ist insbesondere überraschend, da Enzyme bekanntermaßen nur mit bestimmten Substraten reagieren.

Ungesättigte Zucker stellen ein neues Substrat für Lipasen dar. Sie sind empfindlicher als gesättigte Zucker, besitzen eine andere räumliche Struktur und eine zusätzliche funktionelle Gruppe. Daher war es nicht vorauszusehen, daß diese Reaktionen überhaupt ablaufen würden und schon gar nicht, daß sie derart wirtschaftlich durchzuführen sind.

Die Erfindung betrifft somit ein Verfahren zur Veresterung und Esterspaltung mit Hilfe von Lipasen und Esterasen, das dadurch gekennzeichnet ist, daß ungesättigte Zuckerverbindungen der allgemeinen

Formel I,



in der

- 10 a) R¹, R² und R³ (C₁ bis C₁₀)-Acyloxy, dessen C-Atome mit Halogen und/oder Amino und/oder Methoxy und/oder Phenyl und/oder Phenoxy substituiert sein können, und/oder Benzoyloxy, dessen C-Atome mit Nitro und/oder Halogen und/oder (C₁ und C₂)-Alkoxy substituiert sein können,
- 15 b) R¹, R² und R³ Hydroxyl,
- c) R¹ ein geschütztes Hydroxyl und R² und R³ (C₁-C₁₀)-acyloxy und/oder Benzoyloxy,
- d) R¹ und R³ (C₁-C₁₀)-Acyloxy und/oder Benzoyloxy und R² ein geschütztes Hydroxyl,
- e) R¹ ein geschütztes Hydroxyl und R² und R³ Hydroxyl,
- f) R¹ und R³ Hydroxyl und R² ein geschütztes Hydroxyl
- 20 g) R¹ und R² Hydroxyl und R³(C₁-C₁₀)-Acyloxy, Benzoyloxy oder ein geschütztes Hydroxyl und
- 25 h) R¹ und R² Acyloxy und/oder Benzoyloxy und R³ ein geschütztes Hydroxyl sind, eingesetzt werden, wobei Acyloxy und Benzoyloxy jeweils wie unter a) definiert substituiert sein können. Ferner betrifft die Erfindung die Verbindungen der allgemeinen Formel I, in der
- i) R¹ Hydroxyl und R² und R³ (C₁-C₁₀-Acyloxy und/oder Benzoyloxy,
- j) R¹ und R³ (C₁-C₁₀)-Acyloxy und/oder Benzoyloxy und R² Hydroxyl,
- k) R¹ und R² Hydroxyl und R³ (C₁-C₁₀)-Acyloxy oder Benzoyloxy sind, sowie deren Derivate mit geschützter Hydroxylgruppe, wobei Acyloxy und Benzoyloxy jeweils wie unter a) definiert substituiert sein können. Die Erfindung betrifft auch die Verwendung dieser Verbindungen als Zwischenprodukte.

Im folgenden wird die Erfindung detailliert beschrieben, insbesondere in ihren bevorzugten Ausführungsformen. Ferner wird die Erfindung in den Ansprüchen definiert.

Die ungesättigte Verbindung der allgemeinen Formel I ist käuflich (Glucal und Galactal bzw. deren Triacetylverbindungen 3,4,6-Tri-O-acetyl-1,5-anhydro-2-deoxy-arabino-hex-1-enitol oder 3,4,6-Tri-O-acetyl-1,5-anhydro-2-deoxy-lyxo-hex-1-enitol) oder durch chemische Synthese leicht erhältlich [Roth W., Pigman W., Methods Carbohydr. Chem. 2, 405 (1963)].

Bei den geschützten Derivaten der ungesättigten Zuckerverbindungen der allgemeinen Formel I handelt es sich, im wesentlichen a) um Acetale,

bevorzugt beispielsweise Tetrahydropyranylether (THP-Ether Methoxymethylether (MOM-Ether), Methylthiomethylether (MTM-Ether), 2-Methoxyethoxymethylether (MEM-Ether), 2-(Trimethylsilyl) ethoxymethylether (SEM-Ether) und 1-Ethoxyethylether, oder b) um Ether, bevorzugt beispielsweise Methylether, Benzylether, Trimethylsilylether, tertiär-Butyl-dimethylsilylether, tertiär-Butyldiphenylsilylether und Allylether, sowie c) um Ester, bevorzugt beispielsweise Acetate, Chloracetate, Trifluoracetat, Benzoate, Pivaloat, Trifluormethansulfonsäureester, Methansulfonsäureester und Toluolsulfonsäureester.

Unter Acyloxy werden Gruppen mit 1 bis 10 C-Atomen, bevorzugt 1 bis 5 C-Atomen verstanden. Diese C-Atome können mit Halogen, Amino, Methoxy, Phenyl und/oder Phenoxy substituiert sein. Benzyloxy kann mit Nitro, Halogen und/oder (C_1 und C_2)-Alkoxy substituiert sein.

Erfnungsgemäß können Lipasen und Esterasen in dem Verfahren eingesetzt werden, die vorzugsweise aus Mikroorganismen bzw. Pankreas oder Leber von Tieren gewonnen werden. Insbesondere bevorzugt werden Lipasen und Esterasen aus Pseudomonas, Candida, Mucor, Rhizopus, Penicillium und Aspergillus sowie aus Schweineleber und Schweinepankreas verwendet. Die Enzyme sind käuflich, bzw. können nach bekannten Methoden aus dem entsprechenden Mikroorganismus bzw. aus der Leber oder dem Pankreas extrahiert werden. Die Reaktion kann auch mit ganzen Zellen der genannten Mikroorganismen durchgeführt werden, soweit sie das dafür notwendige Enzym enthalten. Es ist dann unter Umständen vorteilhaft die Zellen mit Hilfe an sich bekannter Methoden durchlässig zu machen, so daß die Enzyme leichter an das Substrat gelangen können.

Bei der enzymatischen Veresterung geht man am besten wie folgt vor:

Man löst die Verbindungen Ib, e, f oder g in einem Lösungsmittel, beispielsweise Essigester, Dimethoxyethan, Tetrahydrofuran, tert. Butylmethylether oder Methylethylketon, und gibt dann den Benzoyl- oder Acyldonor hinzu, z.B. einen Carbonsäureester bevorzugt einen Vinylester, wie beispielsweise Vinylacetat, Benzoësäurevinylester, Chloressigsäurevinylester, Methoxyessigsäurevinylester, Phenoxyessigsäurevinylester, Phenylessigsäurevinylester, Aminosäurevinylester, z.B. Z-Glycinvinylester oder Isopropenylacetat, oder anstelle eines Carbonsäureesters die Carbonsäureanhydride, wie z.B. Pivalinsäureanhydrid, Essigsäureanhydrid und Benzoësäureanhydrid. Man kann aber auch den Benzoyl- oder Acyldonor gleichzeitig als Lösungsmittel benutzen. Die Lipase oder Esterase wird in freier oder immobilisierter Form zugegeben, wobei bei Temperaturen zwischen 0 und 80°C, vorzugsweise zwischen 10 und 50°C inkubiert wird.

Zur Immobilisierung der Enzyme kommen alle gängigen, in der Literatur beschriebenen Verfahren in Frage [W. Hartmeier, Trends in Biotechnology 3, 149 (1985); A Rosevaer, J. Chem. Tech. Biotechnol. 34B, 127 (1984)]. Immobilisierte und freie Enzyme können auch im Säulenverfahren eingesetzt werden.

Die Reaktionszeiten sind von Struktur und Löslichkeit des ungesättigten Zuckers, von der Tempe-

ratur und von den Konzentrationsverhältnissen, insbesondere der Enzymmenge abhängig. Sie können zwischen 0,5 Stunden und 3 Tagen liegen, jedoch in aller Regel zwischen 5 und 24 Stunden.

Die Aufarbeitung der Reaktionen erfolgt meist durch Abtrennen, z.B. Abfiltrieren, des freien oder immobilisierten Enzyms, Abdestillieren, der Lösungsmittel und/oder der Acyldonoren im Vakuum und Reinigung der Produkte, sofern nötig, durch Kristallisation, Chromatographie oder Extraktion.

Zur enzymatischen Hydrolyse gibt man die Verbindungen Ia,c,d,f oder h in reiner oder gelöster Form in eine gepufferte, wässrige Lösung und gibt das gewünschte Enzym hinzu. Man kann sowohl bei konstantem pH-Wert als auch ohne pH-Wert-Kontrolle im Bereich von etwa 4 bis 8 arbeiten. Nach Beendigung der Reaktion erhält man das gewünschte Produkt durch Extraktion oder nach Gefrier-Trocknung und Abtrennen von Enzym und Begleitsalzen durch z. B. Filtration oder Chromatographie.

Bestimmte Reaktionen werden vorteilhaft mit bestimmten Enzymen durchgeführt, insbesondere um beste Reaktionsgeschwindigkeiten und Ausbeuten zu erzielen. Die Esterspaltung der Verbindung mit der Formel Ia, in der R¹, R² und R³ Acyloxy und/oder Benzyloxy bedeutet, wird bevorzugt mit Lipasen bzw. Esterasen aus Pseudomonaden durchgeführt. Als Reaktionsprodukt entsteht die Verbindung der Formel II, in der R¹ Hydroxyl- und R² und R³ Acyloxy und/oder Benzyloxy bedeutet. Die Veresterung wiederum kann mit Hilfe von Pseudomonas- bzw. Candida-Lipasen bzw. -Esterasen vorteilhaft durchgeführt werden, jedoch sind die Hauptprodukte unterschiedlich. Aus der Verbindung der Formel Ib, in der R¹, R² und R³ Hydroxyl bedeuten, entsteht durch Inkubation mit dem Enzym aus Pseudomonas die Verbindung der Formel Ij, in der R¹ und R³ Acyloxy und/oder Benzyloxy und R² Hydroxyl bedeuten. Die Übertragung von Benzoylgruppen auf R¹ ist jedoch langsamer als die Übertragung von Acylgruppen, höchstwahrscheinlich aus sterischen Gründen, so daß Pseudomonas-Lipasen auch zur Bildung des 6-O-Monobenzoats genutzt werden können. Mit Candida-Lipasen kann man die Verbindung der Formel Ik erhalten, in der R¹ und R² Hydroxyl bedeuten und R³ Acyloxy oder Benzyloxy ist.

Die entstandenen Verbindungen II,j,k können mit Hilfe der obengenannten Schutzgruppen nach an sich bekannten Methoden chemisch derivatisiert werden (T. W. Greene, Protective Groups in Organic Synthesis, John Wiley & Sons, 1981), um sie dann entweder in organisch-chemischen Reaktionen und/oder erneut in regioselektiven Veresterungen bzw. Esterspaltungen mit Lipasen und Esterasen einzusetzen. So wird beispielsweise chemisch die Verbindung der Formel I hergestellt, in der R¹ eine geschützte Hydroxyfunktion und R² und R³ eine Acyloxygruppe darstellen, und mit Hilfe der Lipasen und Esterasen aus R³ die Acylgruppe abgespalten, so daß R³ dann Hydroxyl bedeutet. Bevorzugt wird bei diesen Reaktionen mit Candida-, Pseudomonas-, Mucor- und Pankreas-Lipasen bzw. -Esterasen gearbeitet.

Bei der Verbindung Ij kann in R² ebenfalls eine

Schutzgruppe eingeführt werden. Wenn derartige Verbindungen dann vorzugsweise mit dem Enzym aus Pseudomonas oder Candida behandelt werden entstehen 2 verschiedene Produkte. Mit Hilfe der ersten erhält man die Verbindung der Formel I, in der R¹ Hydroxyl, R² eine geschützte Hydroxylgruppe und R³ Acyloxy ist, und mit Hilfe der Candida-Lipase die Verbindung der Formel I, in der R¹ Acyloxy, R² eine geschützte Hydroxylgruppe und R³ eine Hydroxylgruppe bedeutet.

Aufgrund der vorangegangenen Beobachtungen ist überraschend abzuleiten, daß Pseudomonas-Lipasen bzw. -Esterasen bevorzugt die sekundäre funktionelle Gruppe R¹ in Verbindungen der Formel I angreifen, während Candida-Lipasen bzw. -Esterasen vorzugsweise die primäre funktionelle Gruppe R³ angreifen. Bei enzymatischen Veresterungen lassen sich anstelle von Pseudomonas-Lipasen bzw. -Esterasen gegebenenfalls auch Lipasen oder Esterasen aus Mucor, Rhizopus und Penicillium spezies zur Katalyse des Angriffs an R¹ in Verbindungen der Formel I b,f,g,i einsetzen, für Hydrolysen an R¹ in Verbindungen der Formel I a,d,h,j in Einzelfällen außer den genannten auch Lipasen aus Schweinepanreas.

Die Vorteile des erfindungsgemäßen Verfahrens liegen in der unerwarteten Regioorientierung der hohen Regioselektivität und der damit verbundenen Einheitlichkeit des Produkts, der hohen Reaktionsgeschwindigkeit sowie der hohen Ausbeute und der leichten Aufarbeitung.

Anhand der folgenden Beispiele wird die Erfindung weiter detailliert beschrieben. Prozentangaben beziehen sich soweit nicht anders angegeben auf das Gewicht.

Beispiele

1. Herstellung von 6-O-Acetylglucal

1,022 g (7 mmol) Glucal werden in 2 ml Essigester und 30 ml Vinylacetat aufgenommen, mit 400 mg Lipase aus *Candida cylindracea* Lipase-OF (Meito Sangyo Co. Ltd.) versetzt und bei Zimmertemperatur über Nacht gerührt. Nach Abtrennen des wiederverwendbaren Enzyms und anschließende Chromatographie oder Kristallisation erhält man 1,12-1,25 g 6-O-Acetylglucal (85-95 %ige Ausbeute).

2. Herstellung von

6-O-Acetyl-3-O-tert.-butyldimethylsilyl-glucal

1,09 g (5 mmol) 3-O-tert.-Butyldimethylsilyl-glucal werden in etwa 10 ml Essigester und 50-70 ml Vinylacetat aufgenommen und mit 1 g Lipase aus *Candida cylindracea* (Sigma) versetzt. Nach etwa 20-24 h stündigen Röhren bei Zimmertemperatur wird das wiederverwendbare Enzym abfiltriert. Einengen im Vakuum und anschließende einfache Säulenfiltration über Kieselgel (in Hexan bzw. Ether/Hexan v:v) ergibt 1,0 - 1,2 g des gewünschten 6-O-Acetyl-3-O-tert.-butyldimethylsilyl-glucal (80-90 %ige Ausbeute).

3. Herstellung von

6-O-Acetyl-4-O-tert.-butyldimethylsilyl-glucal

1,09 g (5 mmol) 4-O-tert.-Butyldimethylsilyl-glucal

werden in 10-20 ml Essigester und 50-80 ml Vinylacetat aufgenommen und mit 1,0 g Lipase aus *Candida cylindracea* (Sigma) versetzt. Nach 20-24 stündigem Röhren bei Zimmertemperatur wird das wiederverwendbare Enzym abfiltriert und die Lösung im Vakuum eingeeengt. Anschließende einfache Säulenfiltration über Kieselgel in Ether/Hexan (~ 1:1 v:v) ergibt 1,1 - 1,2 g 6-O-Acetyl-4-O-tert.-butyldimethylsilyl-glucal (85-90 %ige Ausbeute).

4. Herstellung von 6-O-Acetylgalactal

1,0 g (6,85 mmol) Galactal wird in etwa 1 ml Wasser gelöst, mit 1 - 4 g zerriebenem Molsieb, 25 - 75 ml Vinylacetat und 800 mg Lipase aus *Candida cylindracea* (Sigma) versetzt. Es wird ca. 45 min. bei Zimmertemperatur gerührt. Trocknen, Filtern, Einengen im Vakuum und Chromatographie an Kieselgel (Essigester/Hexan 1:1) oder Kristallisation (aus Essigester/Hexan) ergibt 1,090 bis 1,160 (85-90 %) des gewünschten 6-O-Acetylgalactals.

5. Herstellung von 4,6-Di-O-acetylglucal

7,0 g (30 mmol) Tri-O-acetylglucal werden in 70 ml 0,25 M Phosphatpuffer (pH = 7) mit 7 g Lipase aus *Pseudomonas spec.* (Lipase P, Fa. Amano Pharmaceutical Co., Ltd., Nagoya, Japan) (frei oder an SiO₂ fixiert) bei Zimmertemperatur gerührt. Nach Beendigung der Reaktion (ca. 5-7 h) trennt man das wiederverwendbare Enzym ab. Man erhält das gewünschte 4,6-Di-O-acetylglucal entweder durch Extraktion der wäßrigen Lösung mit CHCl₃ oder Essigester oder nach Gefriertrocknung, anschließendem Aufnehmen in organischen Lösungsmitteln wie Essigester und Abfiltrieren der unlöslichen Begleitstoffe. Das in etwa 90 %iger Ausbeute anfallende 4,6-Di-O-acetylglucal kann ohne weitere Reinigung für weitere Umsetzungen verwendet werden.

6. Herstellung von 3,6-Di-O-acetylglucal

7,3 g (50 mmol) Glucal werden in 50 ml Essigester und 150 ml Vinylacetat aufgenommen und bei Zimmertemperatur mit 2 g Lipase aus *Pseudomonas spec.* (Lipase P, Fa. Amano Pharmaceutical Co., Ltd., Nagoya, Japan) gerührt. Nach Beendigung der Reaktion (DC-Kontrolle, ca. 48 h) wird das wiederverwendbare Enzym abfiltriert und das Lösungsmittel verdampft. Das in über 90 %iger Ausbeute anfallende 3,6-Di-O-acetylglucal kann ohne weitere Reinigung für synthetische Zwecke eingesetzt werden.

7. Herstellung von 3,6-Di-O-acetylgalactal

1,0 g (6,85 mmol) Galactal wird in etwa 1 ml Wasser gelöst, mit 1 - 4 g zerriebenem Molsieb, 25 - 75 ml Vinylacetat und 1,0 g Lipase aus *Pseudomonas spec.* (Amano) versetzt und über Nacht bei Zimmertemperatur gerührt. Nach Trocknen, Filtern und Chromatographie an Kieselgel (Essigester/Hexan 2:3, v:v) erhält man 1,1 bis 1,26 g (70-80 %) 3,6-Di-O-acetylgalactal.

8. Herstellung von 3,6-Di-O-acetylglucal

1,02 g (7 mmol) Glucal, 0,5 - 0,7 ml H₂O und etwa 2 g zerriebenes Molsieb werden in 25 - 50 ml Isopro-

penylacetat aufgenommen und mit 1 g Lipase aus *Pseudomonas spec.* versetzt und 25 - 30 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach Filtration und Einengen im Vakuum wird an Kieselgel chromatographiert (Essigsäureethylester/Hexan 2:3, v:v). Man erhält 0,97 - 1,05 g (60-65 %) 3,6-Di-O-acetylglucal.

5

ster aufgenommen und 5-6 h bei Raumtemperatur mit 1 g Lipase P (*Pseudomonas spec.*) gerührt. Nach Abfiltrieren des wieder verwendbaren Enzyms, Einengen der Lösung und Chromatographie (SiO_2 , Ether/Hexan 1:2) erhält man 6-O-Acetyl-3-O-chloracetyl-galactal in 80 % Ausbeute.

9. Herstellung von

3-O-Acetyl-6-O-tert.butyldimethylsilylglucal

1,0 g (4 mmol) 6-O-tert.Butyldimethylsilyl-glucal wird in 5-10 ml Vinylacetat 3-4 Stunden mit 1,0 g Lipase aus *Pseudomonas spec.* bei Raumtemperatur gerührt. Filtrieren, Einengen und Chromatographie (SiO_2 , Ether/Hexan 1:3) ergibt das gewünschte 3-O-Acetyl-6-O-tert.butyldimethylsilylglucal in etwa 85 %iger Ausbeute (0,98-1,0 g).

10

10. Herstellung von

4-O-Acetyl-6-O-tert.butyldimethylsilyl-glucal

1,03 g (3 mmol) 3,4-Di-O-Acetyl-6-O-tert. butyldimethylsilyl-glucal werden in 10 ml 0,1 M Kaliumphosphatpuffer (pH = 7) mit 0,5-1,0 g Lipase P oder Lipase Fp (Amano) an SiO_2 fixiert bei Raumtemperatur gerührt. Nach Beendigung der Reaktion (5-8 h) trennt man das fixierte, wiederverwendbare Enzym ab. Man erhält das gewünschte 4-O-Acetyl-6-O-tert.butyldimethylsilyl-glucal entweder durch Extraktion der wäßrigen Lösung mit Chloroform oder Essigester oder nach Gefriertrocknung und abschließender Chromatographie an Kieselgel (Ether/Hexan 1:2) in 82 %iger Ausbeute.

15

11. Herstellung von 3-O-Acetyl-6-O-benzoylglucal

1,0 g (4 mmol) 6-O-Benzoylglucal wird in 10-20 ml Vinylacetat aufgenommen und mit 1 g Lipase (*Pseudomonas spec.*) 5 h bei Raumtemperatur gerührt. Abfiltrieren des Enzyms und Kristallisation bzw. Chromatographie an Kieselgel (Essigester/Hexan 1:1) ergibt 3-O-Acetyl-6-O-benzoylglucal in 88-94 %iger Ausbeute (1,03-1,10 g).

20

12. Herstellung von 3-O-Acetyl-6-O-benzoylgalactal

1,0 g (4 mmol) 6-O-Benzoylgalactal wird in 10-15 ml Dimethoxyethan (DME) und 20-25 ml Vinylacetat aufgenommen und mit 1 g Lipase P 8 h bei Raumtemperatur gerührt. Abfiltrieren des Enzyms und Kristallisation bzw. Chromatographie an Kieselgel (Ether/Hexan 1:1) ergibt 3-O-Acetyl-6-O-Benzoylgalactal in 80-85 % Ausbeute.

25

13. Herstellung von

6-O-Acetyl-3-O-chloracetyl-glucal

1,03 g (5,5 mmol) 6-O-Acetylglucal werden in etwa 2-5 ml Dimethoxyethan und 10 ml Chloressigsäurevinylester aufgenommen und ca. 2-3 h bei Raumtemperatur mit 1 g Lipase P (Amano) gerührt. Nach Abfiltrieren des Enzyms, Einengen der Lösung und Chromatographie an Kieselgel (Ether/Hexan 1:2) erhält man 6-O-Acetyl-3-O-chloracetyl-glucal in 80-85 % Ausbeute.

30

14. Herstellung von

6-O-Acetyl-3-O-chloracetyl-galactal

1,03 g (5,5 mmol) 6-O-Acetylgalactal werden in 10-15 ml DME und 20-25 ml Chloressigsäurevinyle-

35

15. Herstellung von

6-O-Benzoyl-3-O-chloracetyl-glucal

1,0 g (4 mmol) 6-O-Benzoylglucal wird in etwa 10-15 ml DME und 20-25 ml Chloressigsäurevinylester gelöst und mit 1 g Lipase P (Amano) 1-2 h

40

gerührt. Abfiltrieren des Enzyms und Chromatographie an Kieselgel (Ether/Hexan 1:1) ergibt 6-O-Benzoyl-3-O-chloracetyl-glucal in 82-87 %iger Ausbeute.

45

16. Herstellung von

6-O-Benzoyl-3-O-chloracetyl-galactal

1,0 g (4 mmol) 6-O-Benzoylgalactal wird in etwa 10-15 ml DME und 20-25 ml Chloressigsäurevinylester aufgenommen und ca. 5-7 h bei Raumtemperatur mit 1 g Lipase aus *Pseudomonas spec.* (Lipase P, Amano) gerührt. Nach Abfiltrieren des wieder ver-

50

wendbaren Enzyms, Einengen der Lösung im Vakuum und Chromatographie an Kieselgel (Ether/Hexan 1:1) bzw. Kristallisation erhält man 6-O-Benzoyl-3-O-chloracetyl-galactal in 80 % Ausbeute (1050 mg).

55

17. Herstellung von 6-O-Benzoylglucal

1,0 g (6,85 mmol) Glucal wird in 1,5-2,0 ml Tetrahydrofuran und 3-5 ml Benzoesäurevinylester aufgenommen und 6 h mit 1 g Lipase aus *Candida cylindracea* (Amano AY-20) bei Raumtemperatur gerührt. Nach Abfiltrieren des Enzyms, Einengen der Lösung im Vakuum, Extraktion des in Essigester aufgenommenen Rückstandes mit wäßriger NaHCO_3 -Lösung und anschließende Chromatographie an Kieselgel (Essigester/Hexan 1:1) erhält man 1,20 g (70 %) des gewünschten 6-O-Benzoylglucals.

60

18. Herstellung von 6-O-Benzoylgalactal

1,0 g (6,85 mmol) Galactal wird in 0,5-1,5 ml H_2O aufgenommen, mit 8 g zeriebenem Molsieb versetzt und 8-10 h bei Raumtemperatur mit 1g *Candida*-Li-

65

pase AY-20 (Meito, Sangyo) oder 1 g Lipase P (Amano) in 10-15 ml Benzoesäurevinylester gerührt.

70

Nach Abfiltrieren des Enzyms, Einengen der Lösung im Vakuum, Extraktion des in Essigester aufgenommenen Rückstandes mit wäßriger NaHCO_3 -Lösung und anschließende Chromatographie an Kieselgel (Essigester/Hexan 1:1) erhält man 65-68 % (ca. 1130 mg) des gewünschten 6-O-Benzoylgalactals.

75

19. Herstellung von

6-O-Acetyl-3-O-methoxyacetylglucal

325 mg (1,73 mmol) 6-O-Acetylglucal werden in 1 ml Dimethoxyethan gelöst, mit 1 ml Methoxyessigsäurevinylester und 325 mg Lipase Fp (*Pseudomonas fluorescens*, Amano) versetzt und 5 $\frac{1}{2}$ Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach Abfiltrieren des Enzyms und Flash-Chromatographie an Kieselgel (Essigester/Hexan 1:2) erhält man 422 mg (1,62 mmol, 93,8 % Ausbeute) des gewünschten 3-O-Me-

thoxyacetyl-6-O-Acetylglucals.

20. Herstellung von

6-O-Benzoyl-3-O-methoxyacetylglucal

200 mg (0,8 mmol) 6-O-Benzoylglucal werden 3 h bei Raumtemperatur in 1 ml Dimethoxyethan mit 1 ml Methoxyessigsäurevinylester und 200 mg Lipase Fp aus *Pseudomonas fluorescens* gerührt.

Abfiltrieren des Enzyms und Flash-Chromatographie an Kieselgel (Hexan und Ether/Hexan 1:1) ergeben 232 mg (0,72 mmol, 90 % Ausbeute) des gewünschten 6-O-Benzoyl-3-O-methoxyacetylglucal.

21. Herstellung von

6-O-Acetyl-3-O-phenoxyacetylglucal

318 mg (1,69 mmol) 6-O-Acetylglucal werden 7 Stunden in 1 ml Dimethoxyethan mit 1 ml Phenoxyessigsäurevinylester und 320 mg Lipase Fp bei Raumtemperatur gerührt.

Abfiltrieren des Enzyms und Flash-Chromatographie an Kieselgel (Essigester/Hexan 1:2) ergaben 478 mg (1,48 mmol, 87,8 % Ausbeute) 6-O-Acetyl-3-O-phenoxyacetylglucal.

22. Herstellung von

6-O-Benzoyl-3-O-phenoxyacetylglucal

226 mg (0,90 mmol) 6-O-Benzoylglucal werden in 1 ml Dimethoxyethan gelöst und mit 1 ml Phenoxyessigsäurevinylester und 220 mg Lipase Fp 3 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach Filtration und Flash-Chromatographie (Kieselgel; Hexan und Ether/Hexan 1:1) erhält man 6-O-Benzoyl-3-O-phenoxyacetylglucal in 88 %iger Ausbeute (304,5 mg, 0,79 mmol).

23. Herstellung von

6-O-Benzoyl-3-O-phenacetetylglucal

200 mg (0,80 mmol) 6-O-Benzoylglucal werden in 1 ml Dimethoxyethan gelöst und mit 1 ml Phenyllessigsäurevinylester und 200 mg Lipase Fp aus *Pseudomonas fluorescens* über Nacht (< 20 h) bei Raumtemperatur gerührt. Nach Abfiltrieren des Enzyms und chromatographischer Reinigung an SiO₂ (Hexan und Ether/Hexan 1:1) erhält man 6-O-Benzoyl-3-O-phenacetetylglucal in 75-85 %iger Ausbeute (220-250 mg).

24. Herstellung von

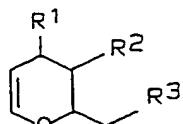
6-O-Acetyl-3-O-phenacetetylglucal

214 mg (1,14 mmol) 6-O-Acetylglucal werden in 1 ml Dimethoxyethan gelöst, mit 1 ml Phenyllessigsäurevinylester und 200 mg Lipase Fp versetzt und 48 h bei etwa 20°C gerührt. Nach Filtration und Chromatographie erhält man 6-O-Acetyl-3-O-phenacetetylglucal in 80-85 %iger Ausbeute (280-297 mg, 0,91-0,97 mmol).

Patentansprüche

1. Verfahren zur enzymatischen Veresterung und Esterspaltung mit Hilfe von Lipasen und Esterasen, dadurch gekennzeichnet, daß ungesättigte Zuckerverbindungen der allgemeinen

Formel I,



I

in der

- a) R¹, R² und R³ (C₁ bis C₁₀)-Acyloxy und/oder Benzoyloxy,
- b) R¹, R² und R³ Hydroxyl,
- c) R¹ ein geschütztes Hydroxyl und R² und R³ (C₁-C₁₀)-Acyloxy und/oder Benzoyloxy,
- d) R¹ und R³ (C₁-C₁₀)-Acyloxy und/oder Benzoyloxy und R² ein geschütztes Hydroxyl,
- e) R¹ ein geschütztes Hydroxyl und R² und R³ Hydroxyl,
- f) R¹ und R³ Hydroxyl und R² ein geschütztes Hydroxyl
- g) R¹ und R² Hydroxyl und R³ (C₁-C₁₀)-Acyloxy oder Benzoyloxy oder ein geschütztes Hydroxyl und
- h) R¹ und R² Acyloxy und/oder Benzoyloxy und R³ ein geschütztes Hydroxyl sind, eingesetzt werden, wobei die C-Atome der Acyloxygruppe mit Halogen und/oder Amino und/oder Methoxy und/oder Phenyl und/oder Phenoxy und die C-Atome der Benzoyloxygruppe mit Nitro und/oder Halogen und/oder (C₁ und C₂)Alkoxy substituiert sein können.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Acyloxygruppe eine Kettenlänge von C₁ bis C₅ hat.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Hydroxylgruppe durch eine Ester- oder eine Etherbindung geschützt oder in ein Acetal überführt wird.

4. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß Lipasen und Esterasen aus Mikroorganismen bzw. aus Pankreas oder Leber von Tieren eingesetzt werden.

5. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß Lipasen und Esterasen aus *Pseudomonas*, *Candida*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Penicillium* und *Aspergillus* eingesetzt werden sowie aus Schweineleber und Schweinepankreas.

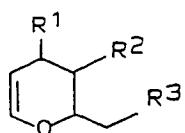
6. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß zur Reaktion mit primären funktionellen Gruppen der Verbindung der allgemeinen Formel I Lipasen oder Esterasen aus *Candida* und zur Reaktion mit sekundären funktionellen Gruppen der genannten Verbindung Lipasen oder Esterasen aus *Pseudomonas* eingesetzt werden.

7. Die Verbindung der allgemeinen Formel I,

60

65

6



I

5

in der

- i) R¹ Hydroxyl und R² und R³ (C₁-C₁₀)-Acyloxy und/oder Benzyloxy,
- j) R¹ und R³ (C₁-C₁₀)-Acyloxy und/oder Benzyloxy und R² Hydroxyl,
- k) R¹ und R² Hydroxyl und R³ (C₁-C₁₀)-Acyloxy

oder Benzyloxy sind, sowie die Hydroxyl-geschützten Derivate, wobei die C-Atome der Acyloxygruppe mit Halogen und/oder Amin und/oder Methoxy und/oder Phenyl und/oder Phenoxy und die C-Atome der Benzyloxygruppe mit Nitro und/oder Halogen und/oder (C₁ und C₂) Alkoxy substituiert sein können.

8. Verwendung der Verbindung nach Anspruch 7 als Zwischenprodukt.

15

20

25

35

40

45

50

55

60

65

7

THIS PAGE BLANK (USPTO)

(19)



Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets

(11)

Veröffentlichungsnummer:

0 337 920
A3

(12)

EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

(21) Anmeldenummer: 89710022.8

(51) Int. Cl.⁵: **C07D 309/30, C12P 17/06**

(22) Anmelddatum: 05.04.89

(23) Priorität: 14.04.88 DE 3812409
19.08.88 DE 3828190

(71) Anmelder: HOECHST AKTIENGESELLSCHAFT
Postfach 80 03 20
D-6230 Frankfurt am Main 80(DE)

(43) Veröffentlichungstag der Anmeldung:
18.10.89 Patentblatt 89/42

(72) Erfinder: Holla, Wolfgang, Dr.
Am Obertor 30
D-6238 Hofheim am Taunus(DE)
Erfinder: Keller, Reinhold, Dr.
Kaunweg 8
D-6232 Soden am Taunus(DE)

(84) Benannte Vertragsstaaten:
CH DE FR GB IT LI NL

(86) Veröffentlichungstag des später veröffentlichten
Recherchenberichts: 10.10.90 Patentblatt 90/41

(54) **Verfahren zur hochregioselektiven Veresterung und Esterspaltung an ungesättigten Zuckerverbindungen mit Hilfe von Lipasen und Esterasen und mit diesem Verfahren herstellbare Produkte.**

(57) An ungesättigten Zuckerverbindungen können mit Hilfe von Lipasen und Esterasen hochregioselektive Veresterungen und Esterspaltungen durchgeführt werden. Es werden bevorzugt Lipasen aus Mikroorganismen bzw. aus Pankreas und Leber von Tieren verwendet.

EP 0 337 920 A3

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE

Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betreff Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int. Cl.4)
X	CHEMICAL ABSTRACTS, Band 96, 1982, Seite 741, Zusammenfassung Nr. 181534c, Columbus, Ohio, US; A.F. HADFIELD et al.: "Cation-exchange resin-catalyzed addition of methanol to benzoylated 1,5-anhydro-2-deoxy-D-hex-1-enitols", & CARBOHYDR. RES. 1982, 101(2), 197-208 * Zusammenfassung * ---	7	C 07 D 309/30 C 12 P 17/06
P, X	ANGEWANDTE CHEMIE INT. ED. ENGL., Band 28, Nr. 2, 1989, Seiten 220-221, VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, DE; E.W. HOLLA: "Enzymatic synthesis of selectively protected glycals" * Seiten 220,221 * -----	1-8	
Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt			RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int. Cl.4)
			C 07 D 309/00 C 12 P 17/00
Recherchenort	Abschlußdatum der Recherche	Prüfer	
DEN HAAG	06-08-1990	FRANCOIS J.C.L.	
KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE		T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E : älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus andern Gründen angeführtes Dokument & : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument	
X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : nichtschriftliche Offenbarung P : Zwischenliteratur			

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

BLACK BORDERS

IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES

FADED TEXT OR DRAWING

BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING

SKEWED/SLANTED IMAGES

COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS

GRAY SCALE DOCUMENTS

LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT

REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY

OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

THIS PAGE BLANK (USPTO)